

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



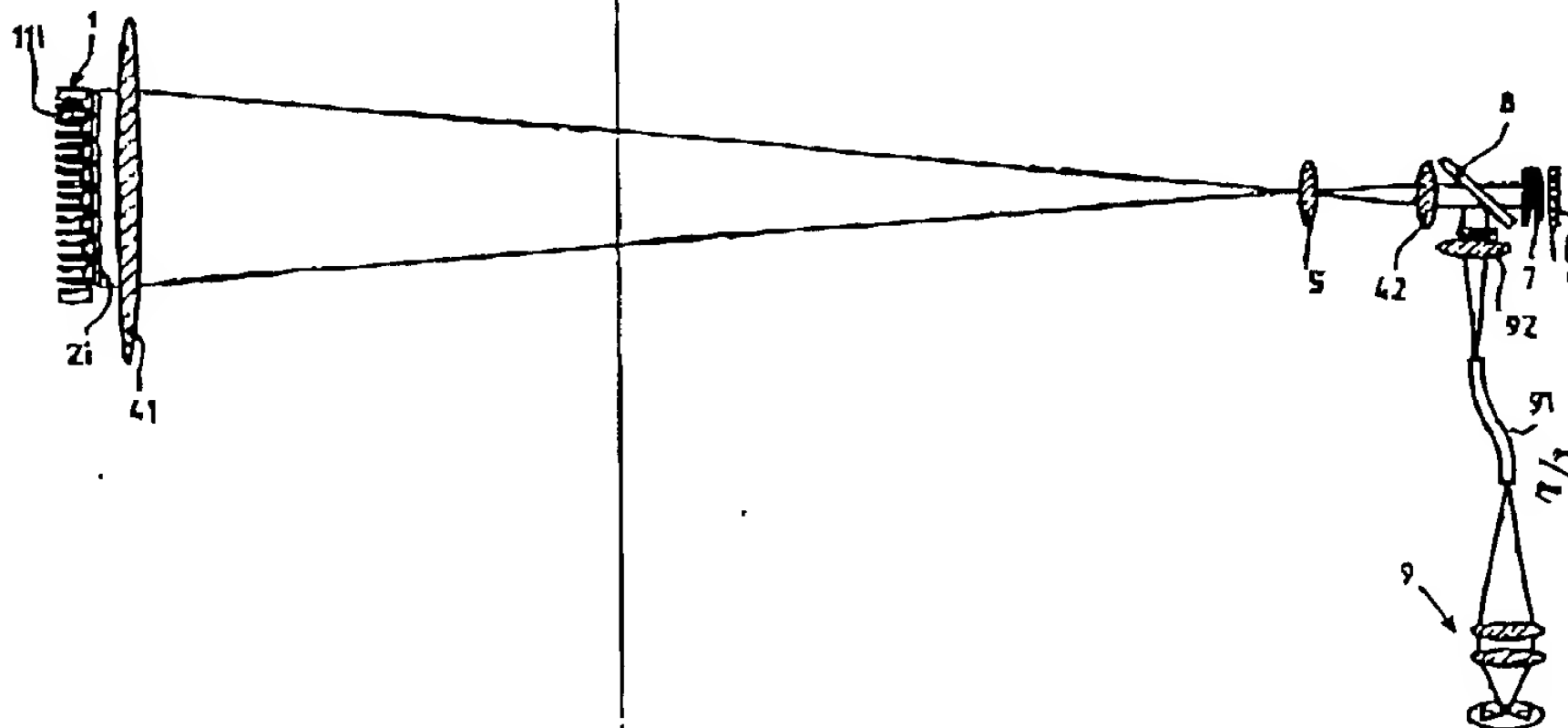
PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 21/25, B01L 3/00, G02B 21/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/23474 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1999 (14.05.99)
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06468	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Oktober 1998 (12.10.98)	
(30) Prioritätsdaten: 197 48 211.2 31. Oktober 1997 (31.10.97) DE	Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser GB): CARL ZEISS [DE/DE]; D-89518 Heidenheim (DE).	
(71) Anmelder (nur für AU CA GB JP): CARL-ZEISS-STIFTUNG handelnd als CARL ZEISS [DE/DE]; D-89518 Heidenheim (DE).	
(72) Erfinder, und: (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VÖLCKER, Martin (DE/DE); Zanger Hauptstrasse 15, D-89551 Königsbrunn (DE). LIEGEL, Jürgen [DE/DE]; Lenzhalde 39, D-73447 Oberkochen (DE). GLUCH, Martin [DE/DE]; Ri- carda-Huch-Weg 5, D-07743 Jena (DE).	

(54) Title: OPTICAL ARRAY SYSTEM AND READER FOR MICRO TITER PLATES

(54) Bezeichnung: OPTISCHES ARRAY-SYSTEM UND READER FÜR MIKROTITERPLATTEN



(57) Abstract

An optical system made up of lens arrays (2i, 7) and normal lenses (41, 5, 42) is particularly suitable for use as a massive parallel reader (approx. 10^2 channels) for micro titer plates (1) and the like in absorption, fluorescence and luminescence.

(57) Zusammenfassung

Ein optisches System mit Linsenarrays (2i, 7) und normalen Linsen (41, 5, 42) ist besonders geeignet als massiv paralleler (ca. 10^2 Kanäle) Reader für Mikrotiterplatten (1) und dergleichen in Absorption, Fluoreszenz und Lumineszenz.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Verinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Litauen	SU	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

Beschreibung:

Optisches Array-System und Reader für Mikrotiterplatten

Die Erfindung betrifft ein optisches System zur Erfassung eines Gegenstandsarrays, besonders in der Ausführung als "Reader" für Mikrotiterplatten.

In der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung wie in der molekularmedizinischen Diagnose werden Fluoreszenz-, Lumineszenz- und Absorptions-Untersuchungen von riesigen Zahlen kleinster Probenmengen benötigt. Hierbei ist ein hoher Probendurchsatz bei der Messung von größter Bedeutung.

Besonders anspruchsvoll sind Kinetikmessungen, deren Zeitkonstanten einem hohen Durchsatz im Wege stehen.

Zur Bereitstellung der Proben stehen Mikrotiterplatten mit gerastert angeordneten Kleinst-Probenbehältern in Standard-Ausführungen mit z.B. 96 oder einem Vielfachen davon, z.B. 384 oder 1536, Probenbehältern (Multi-Well-Microplatten) zur Verfügung. Alternativ sind auch sogenannte Substanz-Chips als Probenträger in Gebrauch.

Ein derartiger Reader wird beispielsweise von der Firma Molecular Devices Corp. USA unter der Bezeichnung SPECTRAMax(R) PLUS angeboten. Eine Lichtquelle und ein Monochromator sind über 8 Lichtleitfasern mit 8 Spiegeloptiken zur Durchlichtbeleuchtung jeweils eines Probenbehälters und mit 8 messenden Photodetektoren verbunden. Es ist also eine achtfache Parallelmessung möglich.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine optische Anordnung anzugeben, die es ermöglicht, einen derartigen Reader mit massiv paralleler Messung auszustatten und so den Probendurchsatz auch bei Kinetikmessungen massiv zu steigern. Dabei soll ein hoher Wirkungsgrad der Lichtwege und ein kompakter, möglichst einfacher Aufbau erreicht werden.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

Selbstverständlich ist eine hohe Meßempfindlichkeit zu gewährleisten.

Ein optisches System nach Anspruch 1 löst diese Aufgabe. Es wird zur Detektion ein Detektorarray vorgesehen, das z.B. als CCD-Array zur Verfügung steht. Klassische Optik mit klassischen Linsen über den ganzen Querschnitt wird mit Linsen-Arrays kombiniert. Damit wird sowohl eine maßstabgerechte Abbildung des gesamten erfaßten Gegenstandsbereichs (Mikrotiterplatte) auf das CCD-Array erreicht als auch eine geeignete Abbildung von Bereichen der einzelnen Wells der Mikrotiterplatte auf das CCD-Array (zwei verschiedene Maßstäbe), bei strikter Kanaltrennung zwischen den verschiedenen Wells.

Vorteilhaft werden dabei die in den Unteransprüchen angegebenen Merkmale ergänzt. Dazu gehören ein Teleskop - einlinsig über den Querschnitt -, ein Mikrolinsenarray vor dem Detektorarray und die Integration einer Auflichtbeleuchtung. Letztere ergibt mit geringstem Aufwand durch doppelte Nutzung der optischen Elemente einen besonders guten Wirkungsgrad und besondere Rauschunterdrückung dadurch, daß genau das Probenvolumen ausgeleuchtet wird, das auch vom Nachweisstrahlengang erfaßt wird.

Mit einem Lochblendenarray kann eine weitere Störunterdrückung erreicht werden.

Näher erläutert wird die Erfindung anhand der Zeichnung.

Fig. 1 zeigt schematisch eine erfindungsgemäße optische Anordnung in einer ersten Ausführung;

Fig. 2 zeigt schematisch einen erfindungsgemäßen Reader.

Die Darstellung der Figur 1 zeigt von allen Array-Elementen jeweils nur drei Exemplare, um übersichtlich das Prinzip

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

darstellen zu können. Eine praktische Ausführung sieht in Anpassung an gebräuchliche Mikrotiterplatten Arrays von $8 \times 12 = 96$ Elementen (Pixeln) vor.

Ein Gegenstandsarray 11, 12, 13 wird von der Mikrotiterplatte 1 mit Vertiefungen (Wells) und darin eingelagerten Substanzproben 110, 120, 130 gebildet. Das gleiche Rastermaß weist das Mini-Linsenarray 21, 22, 23 auf, das aus konventionellen kleinen Linsen zusammengebaut ist und mit einer Brennweite von $f = 7,5$ und einer numerischen Apertur von ca. 0,6 das Licht von einem zentralen Bereich 11, 12, 13 der Proben 110, 120, 130 effektiv einsammelt. In der Zwischenbildebene im Abstand von 380 mm ist eine Lochblende 3 angeordnet, welche ein Übersprechen zwischen den einzelnen Array-Elementen unterbindet.

Das folgende Teleskop aus den Linsen 41 und 42 verkleinert den Bündeldurchmesser von 130 mm auf 15 mm in Anpassung an die Abmessungen des CCD-Arrays. Die dazwischen angeordnete Feldlinse 5 sorgt für die Abbildung des Zwischenbilds und damit des Gegenstandsarrays 11, 12, 13 auf die Elemente des CCD-Arrays 6.

Die gesamte "Kollektiv"-Optik 41, 5, 42 ist in ihrem Durchmesser nur durch die Größe der Mikrotiterplatte 1 bzw. des Gegenstandsarrays 11, 12, 13 bestimmt. Dagegen müßte eine normale CCD-Kamera mit der gleichen numerischen Apertur von 0,6 weitaus größere Linsen haben. Dies wird dadurch ermöglicht, daß die numerische Apertur des erfindungsgemäßen optischen Systems durch die Elemente 21, 22, 23 des Mini-Linsenrasters bestimmt wird.

Das wichtigste an der Anordnung ist, daß frei von Übersprechen jeder Probe 110, 120, 130 genau eine Bildzone auf dem CCD-Array entspricht.

Für Fluoreszenz- oder Absorptions-Messungen wäre eine Beleuchtungseinrichtung zu ergänzen, z.B. in der Art, wie sie mit Fig. 2 näher erläutert wird.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

Für Lumineszenzmessungen ist die Anordnung der Figur 1 bereits unmittelbar geeignet, allerdings wird dafür eine etwa Zehnfache Brennweite des Linsenarrays 21, 22, 23 bevorzugt, womit das erfaßte Probenvolumen anwächst.

Die Anordnung der Fig. 2 ist als Fluoreszenz-Reader ausgelegt. Zunächst hat sie die gleichen Elemente wie die Fig. 1, nämlich Mikrotiterplatte 1 mit Wells 11i, Mini-Linsenarray 2i mit 96 Linsen, große (41) und kleine (42) Teleskoplinse, dazwischen die Feldlinse 5 und das CCD-Array 6. Abweichend kollimiert jedoch das Mini-Linsenarray 2i, es gibt keine Lochrasterplatte, jedoch ein Mikro-Linsenarray 7 unmittelbar vor dem CCD-Array 6 mit 96 Mikrolinsen, welche kollektiv in Mikrostrukturtechnik hergestellt sind und die Abbildung in die Detektorzellen des CCD-Arrays 6 bewirken.

Es wird dabei ein Rastermaß auf dem CCD-Array von etwa vierzig Detektorzellen im Durchmesser erreicht, in dem etwa ein Spot von zwanzig Detektorzellen im Durchmesser von jedem Probenelement ausgeleuchtet wird.

Zwischen der Teleskoplinse 42 und dem Mikro-Linsenarray 7 ist ein Einkoppelspiegel 8 (dichroitischer Spiegel) angeordnet. Eine Beleuchtungseinrichtung 9 gibt über Lichtleitfasern 91 und Kondensor 92 Beleuchtungslicht auf den Spiegel 8, das über das schon beschriebene optische System genau an die Stellen auf der Mikrotiterplatte 1 geleitet wird, die auf den CCD-Detektor 6 abgebildet werden. Das Licht der Beleuchtungseinrichtung 9 wird daher optimal für die Messung ausgenutzt. Störungen durch Beleuchtung der Struktur der Mikrotiterplatte 1 und dergleichen entfallen.

Die Beleuchtungseinrichtung kann aus einer Weißlichtquelle, z.B. einer Xenon-Gasentladungslampe, bestehen, auch kombiniert mit einem Monochromator zur Ausbildung eines Spektrophotometers.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

Auch eine Linienquelle, z.B. ein Laser, kommt in Frage.

Mit einer diskreten Scan-Einrichtung für die Relativbewegung von Mikrotiterplatte 1 und Mini-Linsenarray 2i einschließlich der gesamten optischen Anordnung kann z.B. eine 384-Well-Mikrotiterplatte mit vier Stellungen nacheinander komplett ausgelesen werden.

Übliche Filter in Beleuchtungs- und Nachweisstrahlengang zur Trennung von Beleuchtungs- und Fluoreszenzlicht können zur Anpassung an verschiedene Wellenlängen zusammen mit dem dichroitischen Spiegel in einem auswechselbaren Modul angeordnet sein und so einen schnellen Wechsel des Fluoreszenzsystems ermöglichen.

Aus dem gleichen Grund wird vorzugsweise zumindest das gegenstandsseitige Linsenarray 2i achromatisiert, indem jede einzelne Linse durch eine Linsengruppe mit achromatischer Korrektur ersetzt wird. Als Spektralbereich wird dann typischerweise etwa 350 bis 800 nm vorgesehen.

Wird der Strahlteiler 8 nicht dichroitisch ausgebildet und wird über der Mikrotiterplatte 1 ein Spiegel angeordnet, so kann einfach eine Anordnung zur Absorptionsmessung analog dem beschriebenen Gerät der Firma Molecular Dynamics abgeleitet werden. Natürlich kann auch eine Auflichtbeleuchtung vorgesehen werden.

Die Anordnung ist konfokal in dem Sinne, daß ein in der Probe räumlich begrenzter Beleuchtungsfleck mit einem räumlich begrenzten Detektionsbereich überlagert wird. Die Blende im Beleuchtungsstrahlengang kann das Faserende oder eine Leuchtfeldblende darstellen, die Blende im Detektionsstrahlengang kann durch selektives Auslesen der CCD-Pixel im Bereich der einzelnen Beleuchtungsflecken, durch ein Lochblendenarray vor der CCD-Kamera oder durch eine Feldblende im Bereich der Feldlinse erzeugt werden.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

Auch eine Durchlichtbeleuchtung kann mit dieser Konfokalität realisiert werden, wenn ein entsprechendes Linsenarray wie das Linsenarray 2i vorgesehen wird.

Bei der Ausführung als Reader für Fluoreszenzmessungen wird vorzugsweise ein Fokusbereich von 50 bis 500 μm , besonders 150 μm , bei einer numerischen Apertur von 0,6 bis 0,7 vorgesehen.

Als Reader für Lumineszenz wird der Fokusbereich besser dem Töpfchendurchmesser (Durchmesser eines Wells) von 3 bis 4 mm bei 384er Mikrotiterplatten angepaßt.

Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) kann mit dem gleichen optischen Konzept parallelisiert und damit für High-Throughput-Anwendungen tauglich werden. Für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ist hier jedoch die Reduzierung des Meßvolumens in den Bereich von Femtolitern mit einem Fokusbereich von 0,1 - 10 μm vorteilhaft. Die minimale Korrelationszeit ist jedoch durch die Integrations- und Auslesezeit des CCD-Arrays begrenzt. Parallel auslesbare Detektor-Arrays wie APD-Arrays sind daher in dieser Anwendung zu bevorzugen.

Zur leichten Anpassung an die unterschiedlichen Meßverfahren wird daher ein modular aufgebauter Reader vorgeschlagen, bei dem das probenseitige Linsenarray 2i austauschbar ist.

Es sind damit folgende Vorteile der Erfindung hervorzuheben:

- Hohe Kanalzahl mit größenordnungsmäßig 10^4 Kanälen ist gut möglich und ergibt wirkungsvolle Parallelisierung.
- Eine hohe Fluoreszenz-Nachweisempfindlichkeit ist durch die große mögliche Apertur der Einzellinsen 21, 22, 23 des Mini-Linsenarrays gegeben.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

- Eine geringe Leistung der Lichtquelle 9 ist ausreichend, weil die Beleuchtung strukturiert erfolgt und die hohe Fluoreszenz-Nachweissensfähigkeit gegeben ist.
- Eine starke Unterdrückung von störender Fluoreszenz von außerhalb des Meßvolumens (typisches Meßvolumen bei Fluoreszenzmessungen für Mikrotiterplatten und 96-Kanal-Optik: wenige Nanoliter) durch die konfokale Detektion erlaubt die Messung von homogenen Proben trotz möglicherweise starker Fluoreszenzkonzentrationen auf dem Boden durch Ausfällungen und trotz starker Eigenfluoreszenz der Böden und Wände der Wells in der Mikrotiterplatte.
- Eine Unabhängigkeit von der Füllhöhe bei Fluoreszenzmessungen wird durch die Konfokalität ebenfalls bewirkt.
- Fluoreszenzfilter und Strahlteiler mit Standardmaßen (Durchmesser im Bereich von 25 mm) können verwendet werden, da die großen Abmessungen der Mikrotiterplatten durch das Teleskop verkleinert werden (Durchmesser am CCD-Array ca. 15 mm).
- Das Übersprechen zwischen benachbarten Proben (Wells) ist durch die lokale Beleuchtung und konfokale Detektion prinzipiell gering und kann durch eine Lochmaske oder Stege zwischen den Linsenelementen der Linsenarrays und simultane Verwendung z.B. nur jedes zweiten Wells (z.B. 96-Kanal-Detektion bei 384er-Mikrotiterplatten) weiter reduziert werden.
- Die Datenerfassung ist auch bei der hohen Kanalzahl durch Verwendung eines CCD-Arrays einfach.
- Flexibilität im Format ist gegeben, da das 96er Raster des Readers auch zu höher integrierten Mikrotiterplatten (z.B.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

384, 864, 1536 Wells) und zu sogenannten Zell-Chips und DNA-Chips paßt.

- Kinetische Fluoreszenzmessungen werden durch die Vielkanalausführung besonders unterstützt.
- An zellbasierten Arrays können Fluoreszenzmessungen durch Fokussierung des Linsenarrays 2i auf Zellen, die auf dem Boden des Wells aufgebracht sind, durchgeführt werden. Ortsaufgelöstes Auslesen der individuellen, hier möglichst großen Spots auf der CCD mit einer Auflösung von etwa der Zellgröße oder besser erlaubt eine wesentlich detailliertere, ortsaufgelöste Analyse der biologischen Funktion der zu untersuchenden Substanz. Dieses High Content Screening (HCS) erlaubt z.B. den Vergleich der Fluoreszenzkonzentrationen außerhalb, auf und innerhalb der Zelle und im Zellkern. Auch hier ist die Kinetik wichtig.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

Patentansprüche:

1. Optisches System mit einem Linsenarray (21-23) und einer Feldlinse (5), das ein Gegenstandsarray (11-13) auf ein Detektorarray (61-63) abbildet.
2. Optisches System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Linsenarray (21-23) und Feldlinse (5) und dieser und dem Detektorarray (61-63) je eine Linse (41, 42) eines Teleskops angeordnet ist.
3. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Detektorarray (6) ein Mikrolinsenarray (7) angeordnet ist.
4. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Auflichtbeleuchtung (9, 91, 92) integriert ist.
5. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Lochblendenarray (3) zwischen Linsenarray (21-23) und Feldlinse (5) angeordnet ist.
6. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gegenstandsarray eine Mikrotiterplatte (1) gefüllt mit der zu untersuchenden Probe oder ein Substanz-Chip ist.
7. Optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß das Detektorarray (6) ein CCD-Array oder ein Photodioden-Array ist.
8. Anordnung nach mindestens einem der Ansprüche 1-7, gekennzeichnet durch die Ausbildung als Reader für Mikrotiterplatten mit Absorption, Fluoreszenz einschließlich Fluoreszenzkorrelationspektroskopie, oder Lumineszenz.

WO 99/23474

PCT/EP98/06468

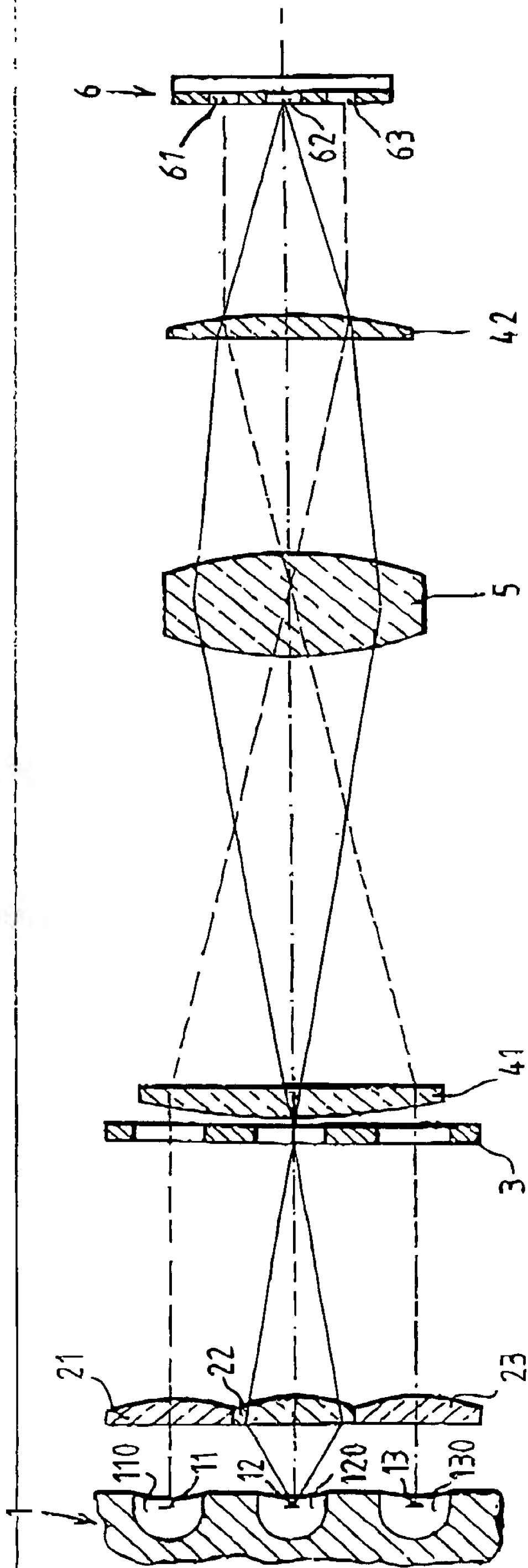
9. Spektrophotometer, dadurch gekennzeichnet, daß es ein optisches System nach mindestens einem der Ansprüche 1-8 enthält.

WO 99/23474

1/2

PCT/EP98/06468

FIG. 1

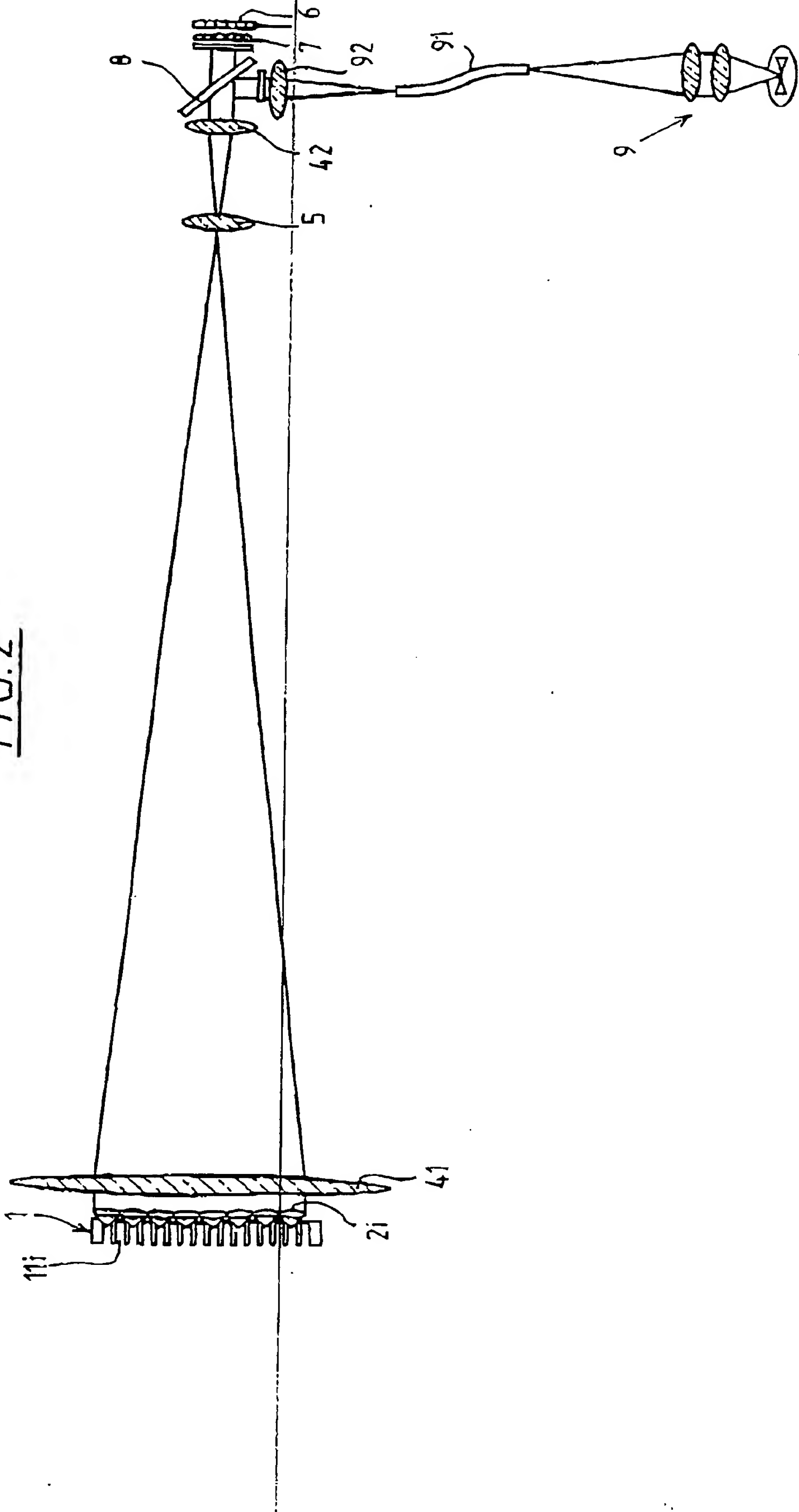


WO 99/23474

2/2

PCT/EP98/06468

FIG. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No PCT/EP 98/06468		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N21/25 B01L3/00 G02B21/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N B01L G02B		
Documentation searched other than minimum documentation (to the extent that such documents are included in the fields searched)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 34171 A (JOHNSON KENNETH C) 18 September 1997	1, 2, 4, 7
Y	see abstract see page 5, line 21 - page 6, line 13 see figure 1	5, 6, 8, 9
Y	WO 95 01559 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ; EIGEN MANFRED (DE); HENCO KARSTEN (DE); SC) 12 January 1995 see figure 35 see page 31, paragraph 3 - page 32, paragraph 2 see page 38, paragraph 2	6, 8, 9
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are cited in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 January 1999		Date of mailing of the international search report 26/01/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Palamiden 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Verdoodt, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/EP 98/06468

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 196 51 667 A (GROSKOPF RUDOLF DR ING) 11 September 1997 see column 3, line 18 - line 34 see claim 1 see figures 1,14	1,3
X	DE 196 24 421 A (ZEISS CARL FA) 2 January 1997 see page 3, line 49 - line 52 see figure 1	1,3
Y	EP 0 679 864 A (KOMATSU MFG CO LTD) 2 November 1995 see figure 1 see column 9, line 28 - line 34	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on prior art

International Application No

PCT/EP 98/06468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9734171 A	18-09-1997	AU 1975197 A	01-10-1997
WO 9501559 A	12-01-1995	DE 59405534 D	30-04-1998
		EP 0706646 A	17-04-1996
DE 19651667 A	11-09-1997	JP 10206129 A	07-08-1998
DE 19624421 A	02-01-1997	NONE	
EP 0679864 A	02-11-1995	US 5659420 A	19-08-1997
		WO 9509346 A	06-04-1995
		JP 7181023 A	18-07-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern als Aktenzeichen
PCT/EP 98/06468

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N21/25 B01L3/00 G02B21/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N B01L G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr.

X	WO 97 34171 A (JOHNSON KENNETH C) 18. September 1997	1, 2, 4, 7
Y	siehe Zusammenfassung siehe Seite 5, Zeile 21 - Seite 6, Zeile 13 siehe Abbildung 1	5, 6, 8, 9
Y	WO 95 01559 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH ; EIGEN MANFRED (DE); HENCO KARSTEN (DE); SC) 12. Januar 1995 siehe Abbildung 35 siehe Seite 31, Absatz 3 - Seite 32, Absatz 2 siehe Seite 38, Absatz 2	6, 8, 9

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausübung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Januar 1999

Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts

26/01/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäische Patentamt, P.O. 5018 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Verdoordt, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. als Kennzeichen
PCT/EP 98/06468

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	DE 196 51 667 A (GROSKOPF RUDOLF DR ING) 11. September 1997 siehe Spalte 3, Zeile 18 - Zeile 34 siehe Anspruch 1 siehe Abbildungen 1, 14	1, 3
X	DE 196 24 421 A (ZEISS CARL FA) 2. Januar 1997 siehe Seite 3, Zeile 49 - Zeile 52 siehe Abbildung 1	1, 3
Y	EP 0 679 864 A (KOMATSU MFG CO LTD) 2. November 1995 siehe Abbildung 1 siehe Spalte 9, Zeile 28 - Zeile 34	5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung... die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: das Abkürzzeichen
PCT/EP 98/06468

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9734171	A	18-09-1997	AU	1975197 A	01-10-1997
WO 9501559	A	12-01-1995	DE	59405534 D	30-04-1998
			EP	0706646 A	17-04-1996
DE 19651667	A	11-09-1997	JP	10206129 A	07-08-1998
DE 19624421	A	02-01-1997	KEINE		
EP 0679864	A	02-11-1995	US	5659420 A	19-08-1997
			WO	9509346 A	06-04-1995
			JP	7181023 A	18-07-1995

- 1 -

WO 99/23474

Description:

Optical Array System and Reader for Microtiter Plates

The invention concerns an optical system for detecting an object array, in particular one designed as a "reader" for microtiter plates.

Both the development of active pharmaceutical substances and the diagnostics of molecular medicine require fluorescence, luminescence, and absorption analyses of huge numbers of very small sample amounts, with a high sample throughput during the measurement being of critical importance.

Because their time constants present an obstacle to achieving high throughput, kinetic measurements are especially difficult to perform.

For the preparation of samples microtiter plates comprising miniature sample wells arranged in a grid are available in standard types, such as with 96 or a multiple thereof, e.g., 384 or 1536, sample wells (multi-well microplates). Alternatively, so-called substance chips are also used as sample carriers.

- 2 -

A reader of such a type is offered, for example, by Molecular Devices Corp. USA under the designation SPECTRAMax® PLUS. A light source and a monochromator are connected by means of 8 optical fibers with 8 mirror optics for transmittent illumination of one sample well each, and with 8 measuring photodetectors. This design therefore enables eight-fold parallel measurements.

It is the task of the invention to specify an optical arrangement that makes it possible to equip such a reader with a capacity for massively parallel measurement so as to result in a dramatic increase of the sample throughput even in kinetic measurements. The aim is to achieve both a high efficiency of the optical path lengths and a compact design that is as simple as possible. Of course, a high measuring accuracy must also be assured.

This task is solved by an optical system according to claim 1. A detector array available, for instance, as a CCD array, is provided for detection purposes. Classical optics with classical lenses are combined with lens arrays across the entire cross-section. This makes it possible to achieve both a projection of the entire detected object area (microtiter plate) that is true to scale onto the CCD array and a suitable projection of sections of the individual wells of the microtiter plate onto the CCD array (two different

- 3 -

scales) under strict channel separation between the individual wells.

An advantageous embodiment of the invention is supplemented by the features specified in the subclaims. These include a telescope (single-lens across the cross-section), a microlens array located in front of the detector array, and the integration of an incident illumination. By means of twin utilization of the optical elements this incident illumination yields a high efficiency with minimal expenditure as well as special noise suppression owing to the fact that exactly the same sample volume that is also detected by the detecting optical path is illuminated.

A further noise suppression can be achieved by employing a pinhole diaphragm array.

The invention is explained in detail in the drawing.

Fig. 1 shows the diagram of the first embodiment of an optical arrangement according to the invention;

Fig. 2 shows the diagram of a reader according to the invention.

The representation in Figure 1 shows only three elements each of all array elements, so as to furnish a clear illustration of the principle involved. A practical embodiment provides arrays of $8 \times 12 = 96$ elements (pixels) that match standard microtiter plates.

- 4 -

An object array 11, 12, 13 is formed by the microtiter plate 1 with depressions (wells) containing substance samples 110, 120, 130. The mini-lens array 21, 22, 23 provided with the same pitch is composed of conventional small lenses and uses a focal length of $f = 7.5$ and a numerical aperture of approx. 0.6 to collect light effectively from a central region 11, 12, 13 of samples 110, 120, 130. In the intermediate image plane a pinhole diaphragm is arranged at a distance of 380 mm, which prevents crosstalk between individual array elements.

The following telescope consisting of lenses 41 and 42 reduces the ray bundle diameter of 130 mm down to 15 mm to adapt it to the dimensions of the CCD array. The field lens 5 located in between produces the intermediate image and thus provides the projection of the object array 11, 12, 13 onto the elements of the CCD array 6.

The diameter of the entire "collective" optics 41, 5, 42 is determined solely by the size of the microtiter plate 1 or of the object array 11, 12, 13, respectively. In contrast, a normal CCD camera with the same numerical aperture of 0.6 would have to be equipped with much larger lenses. This is made possible by the fact that the numerical aperture of the optical system according to the invention is determined by the elements 21, 22, 23 of the mini-lens grid.

- 5 -

The most important aspect of this arrangement is the fact that exactly one image zone on the CCD array corresponds to each of the samples 110, 120, 130 without any crosstalk.

For fluorescence or absorption measurements an illumination would be supplemented, such as of the type explained in detail using Figure 2.

For luminescence measurements the set-up depicted in Figure 1 is already directly suitable, although in this case a focal length of ten times that of lens array 21, 22, 23 is preferred, which results in an increase of the detected sample volume.

The arrangement shown in Figure 2 is designed as a fluorescence reader. Basically it is provided with the same elements as the arrangement shown in Figure 1, viz., microtiter plate 1 with wells 11i, mini-lens array 2i with 96 lenses, large (41) and small (42) telescope lenses, in between the field lens 5, and the CCD array 6. This arrangement differs, however, in that the mini-lens array 2i collimates; that there is no hole matrix plate, but instead a microlens array 7 is provided directly in front of the CCD array 6, which comprises 96 lenses that are collectively produced using microstructure technology and cause the projection onto the detector cells of the CCD array 6.

This arrangement achieves a pitch on the CCD array of approx. 40 detector cells in diameter, in which a spot with a

- 6 -

diameter of approx. 20 detector cells is illuminated by each sample element.

Between the telescope lens 42 and the microlens array 7 a coupling-into mirror (dichroic mirror) is provided. An illumination 9 projects illuminating light onto the mirror 8 by means of optical fibers 91 and condenser 92, which light is guided by means of the optical system described above exactly to the locations on the microtiter plate 1 that are projected onto the CCD detector 6. The light of the illumination 9 is therefore optimally utilized in the measurement. Noise, such as interference caused by illuminating the structure of the microtiter plate 1, does not occur.

The illumination may consist of a white light source, such as a xenon gas-discharge lamp, which may also be combined with a monochromator to form a spectrophotometer.

A line source, such as a laser, is also possible.

By means of a discrete scanning device for the relative movement of the microtiter plate 1 and the mini-lens array 21, including the entire optical set-up, a 384-well microtiter plate with four positions, for example, can be read completely read in sequence.

Common filters used in the illuminating and detecting optical paths for the purpose of separating the illumination light from the fluorescence light may be provided together

- 7 -

with the dichroic mirror in an exchangeable module for adaptation to different wave lengths, thus enabling a quick change of the fluorescence system.

For the same reason, preferably at least the object-side lens array 2i is achromatized by replacing each individual lens with a lens cluster with achromatic correction. A spectral range of approx. 350-800 nm is then typically provided.

If the beam divider 8 is not designed dichroically and a mirror is provided above the microtiter plate 1, a simple arrangement for absorption measurement can be derived that is analogous to the device produced by Molecular Dynamics described above. Of course, an incident illumination may also be provided.

The set-up is confocal in the sense that a spatially limited detection area is superimposed on a spatially limited illumination spot in the sample. The aperture in the illuminating optical path may represent the end of the fiber or a field stop, while the aperture in the detecting optical path may be produced by selective reading of the CCD pixels in the area of the individual illumination spots, by means of a pinhole diaphragm array located in front of the CCD camera, or by means of a field stop within the range of the field lens.

- 8 -

A transmittent illumination also can be implemented with this confocality, if a corresponding lens array, such as the lens array 2i, is provided.

In the embodiment as a reader for fluorescence measurements a focal diameter of 50-500 μm , in particular 150 μm , is preferably provided with a numerical aperture of 0.6 to 0.7.

In a reader for luminescence the focal diameter is better adapted to the droplet diameter (i.e., the diameter of one well) of 3-4 mm in the case of microtiter plates with 384 wells.

Fluorescence-correlation spectroscopy (FCS) can be achieved in parallel with the same optical concept, thus making it suitable for high-throughput applications. In this case, however, a reduction in the measuring volume within the femtoliter range with a focal diameter of 0.1-10 μm is advantageous for the purpose of achieving a good S/N ratio. The minimum correlation time, however, is limited by the integration and reading time of the CCD array. Parallel readable detector arrays, such as APD arrays, are therefore to be preferred in this application.

Therefore, with a view to making a simple adaptation to the different measurement methods possible, a reader having a modular design is proposed, in which the sample-side lens array 2i is exchangeable.

- 9 -

Thus the following advantages of the invention are to be emphasized:

- A high number of channels with an order of magnitude of 10^2 is easily possible and results in effective parallelization.
- A high fluorescence detecting sensitivity is achieved by an possible large aperture of the individual lenses 21, 22, 23 of the mini-lens array.
- Because of the structured illumination and the high fluorescence detecting sensitivity, a low power of the light source 9 is sufficient.
- A high degree of suppression of interfering fluorescence from outside the measuring volume (the typical measuring volume in fluorescence measurements for microtiter plates and 96/channel optics amounts to several nanoliters) by means of confocal detection permits the measuring of homogeneous samples despite potentially high fluorescence concentrations on the floor of the wells and despite the high degree of autofluorescence of the floors and walls of the wells in the microtiter plate.
- The confocality also achieves independence from the filling level.
- Fluorescence filters and beam dividers of standard dimensions (diameter in the range of 25 mm) can be used, because the large dimensions of the microtiter plate are

- 10 -

reduced by the telescope (diameter at the array approx. 15 mm).

- Crosstalk between adjacent samples (wells) is in principle low because of the local illumination and focal detection, and can be further reduced by means of a dot mask or ridges between the lens elements of the lens arrays and simultaneous use, for example, of only every second well (such as 96-channel detection in the case of microtiter plates with 384 wells).

- The use of a CCD arrays keeps data acquisition simple despite the high number of channels.

- Flexibility of the format results from the fact that the 96-element grid of the reader is also suitable for microtiter plates with higher integration (such as plates with 384, 864, or 1536 wells) as well as for so-called cell chips and DNA chips.

- The multichannel design especially supports kinetic fluorescence measurements.

- Fluorescence measurements of cell-based arrays can be performed by focusing the lens array 2i on cells arranged on the floor of the well. Position-resolved reading of the individual spots on the CCD, which here should be as large as possible, with a resolution of approximately the size of the cell or higher permits a significantly more detailed, position-resolved analysis of the biological function of the

- 11 -

substance to be examined. This high content screening (HCS) allows, for example, a comparison of the fluorescence concentrations outside, on, and inside the cell and within the cell nucleus. Here, too, kinetics is important.

Claims:

1. An optical system comprising a lens array (21/23) and a field lens (5), which projects an object array (11-13) onto a detector array (61/63).
2. The optical system according to claim 1, characterized in that between the lens array (21-23) and the field lens (5), and between the field lens (5) and the detector array (61-63) one lens each (41, 42) of a telescope is arranged.
3. The optical system according to at least one of claims 1-2, characterized in that a microlens array (7) is arranged in front of the detector array (6).
4. The optical system according to at least one of claims 1-3, characterized in that an incident illumination (9, 91, 92) is integrated into the system.
5. The optical system according to at least one of claims 1-4, characterized in that a pinhole diaphragm array (3) is arranged between the lens array (21-23) and the field lens (5).

- 12 -

6. The optical system according to at least one of claims 1-5, characterized in that the object array is either a microtiter plate (1) filled with the sample to be analyzed or a substance chip.

7. The optical system according to at least one of claims 1-6, characterized in that the detector array (6) is either a CCD array or a photodiode array.

8. The optical system according to at least one of claims 1-7, characterized by its design as reader for microtiter plates with absorption, fluorescence, including fluorescence-correlation spectroscopy, or luminescence.

9. A spectrophotometer, characterized in that it includes an optical system according to at least one of claims 1-8.